



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Achados imunofenotípicos de leucócitos em gatos

Deborah Castro

Areia, 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Achados imunofenotípicos de leucócitos em gatos

DEBORAH CASTRO

**Trabalho de conclusão de curso
realizado apresentado como requisito
parcial para a obtenção do título de
Bacharel em Medicina Veterinária pela
Universidade Federal da Paraíba, sob
orientação da Prof. Dra. Fabiana
Satake.**

Areia, 2017

Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, Campus II, Areia – PB.

C355a Castro, Deborah.

Achados imunofenotípicos de leucócitos em gatos / Deborah Castro. - Areia:
UFPB/CCA, 2017.
27 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Centro de
Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2017.

Bibliografia.

Orientadora: Fabiana Satake.

1. Gatos – Imunofenotipagem 2. Felinos – Perfil imunofenotípico 3. Linfócitos em
gatos I. Satake, Fabiana (Orientadora) II. Título.

UFPB/CCA

CDU: 612.112:636.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Deborah Castro

ACHADOS IMUNOFENOTÍPICOS DE LEUCÓCITOS EM GATOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária, pela Universidade Federal da Paraíba.

Aprovada em:

Nota:

Banca Examinadora

Prof. Dra. Fabiana Satake – CCA – UFPB
Orientadora

Prof. Dr. Felipe Nael Seixas – CCA – UFPB

MV Dra. Tereza Emmanuelle de Farias Rotondano – CCA – UFPB

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda minha família por sempre me incentivar a seguir meu sonho. Em especial aos meus pais, por servirem de exemplo e acreditarem no meu melhor, e a tia Jaci por me acolher tão bem e me lembrar o significado de família.

Agradeço a todos os docentes que fizeram parte da minha formação acadêmica, em especial à minha orientadora, Fabiana Satake, por ter aceitado me auxiliar e tornado possível o presente trabalho. E ao professor Walter Pereira, pela ajuda no último instante.

Agradeço à melhor turma que eu poderia ter, em especial aos amigos que me acompanharam nos momentos de diversão e de tensão durante toda a graduação: Amabile, Caio, Camila, Iago, Jessica, Mayara, Neto, Rafael, Rodolfo, Walter... sem vocês eu não teria aproveitado metade do que aproveitei nesses últimos sete anos.

Ao CNPq pela oportunidade única que tive de participar do Ciência sem Fronteiras, sem o qual eu não teria esse material, nem teria tido a melhor experiência da minha vida, onde aprendi a valorizar minha origem e as pessoas que fazem parte da minha vida. Foi lá também que conheci pessoas maravilhosas e que terei pra sempre no meu coração e na vida: Ju, Má, Nath, Pam. Fizeram essa experiência incrível se tornar ainda mais divertida. Obrigada por me mostrarem que amizade de verdade não tem fronteiras.

A Dorothee Bienzle, a quem eu devo esse trabalho por inteiro, por ter me acolhido tão bem em seu laboratório e ter compartilhado comigo parte de seu brilhante conhecimento e não só isso, mas por ter me feito sentir querida e bem-vinda.

Ao meu noivo, Bradley Memmott, pela paciência infinita, pelo incentivo quando eu parecia desistir, e pela positividade de sempre. Apesar de todos os obstáculos que a vida dá, você sempre me mostra o que vale a pena e faz tudo parecer mais fácil.

E não poderia deixar de agradecer, separadamente, às minhas peludinhas, Cindy e Fiona. Por serem meu incentivo a lutar por essa profissão, por me lembrarem que é preciso, sim, fazer pausas durante o estudo e por me arrancarem sorrisos com um simples abanar de rabo.

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

(José de Alencar)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Relação de anticorpos e suas quantidades a serem adicionadas em cada tubo, para caracterização imunofenotípica de linfócitos em gatos, na Universidade de Guelph, Canadá, no ano de 2014 15

TABELA 2. Porcentagem de células apresentando marcadores que se mostraram dentro da normalidade em estudo de imunofenotipagem de linfócitos felinos realizado na Universidade de Guelph, Canadá, no ano de 2014 17

TABELA 3. Porcentagem de células apresentando marcadores que não passaram no teste de normalidade em estudo de imunofenotipagem de linfócitos felinos realizado na Universidade de Guelph, Canadá, no ano de 2014 17

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Resultado disponibilizado pelo programa BD CellQuest Pro dos marcadores cujos valores estavam dentro da normalidade, em amostra de sangue do gato 8, durante estudo de imunofenotipagem em felinos na Universidade de Guelph, Canadá, no ano de 2014 16

FIGURA 2. Diagrama de caixa indicando as variâncias de cada antígeno expressado por leucócitos de gatos em estudo de imunofenotipagem linfocítica realizado na Universidade de Guelph, Canadá, em 2014 18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC – Aloficocianina

CD – Cluster of Differentiation

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

FeLV – Vírus da Leucemia Felina

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina

g – Gravidade

GAM-PE – Goat anti-mouse ligado a Ficoeritrina

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IC – Índice de Confiabilidade

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

OVC – Ontario Veterinary College

PAAF – Punção Aspirativa por Agulha Fina

PE – Ficoeritrina

Q1 – Quartil 25%

Q3 – Quartil 75%

RESUMO

CASTRO, Deborah, Universidade Federal da Paraíba, Janeiro de 2017. **Achados imunofenotípicos de leucócitos em gatos.** Orientadora: Fabiana Satake.

A imunofenotipagem é uma técnica por citometria de fluxo que vem crescendo cada vez mais na medicina veterinária. Com ela, é possível detectar e diferenciar neoplasias a partir da quantificação de células específicas, direcionando assim o tratamento e permitindo um melhor acompanhamento da doença. Para isso, no entanto, é fundamental conhecer o padrão das células de cada espécie. O presente estudo teve como objetivo padronizar o perfil imunofenotípico em gatos saudáveis, quantificando células linfocitárias CD4, CD5, CD8, CD8 β , CD21, CD22 e MHC tipo II por citometria de fluxo. Foi coletado sangue com EDTA de 32 animais saudáveis e analisados em citômetro FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). A concentração média encontrada para cada antígeno foi a seguinte: CD4 24,9%, CD8 12,3%, CD22 32,9%, MHC II 64,2%, sendo a proporção CD4:CD8 de 2,31%. Os antígenos expressados pelas células restantes não apresentaram resultados estatisticamente significativos e assim foi apresentada a mediana de cada um deles sendo 24,2%, 25,3% e 11,4% respectivamente para CD5, CD21 e CD8 β . Embora novos estudos sejam necessários para confirmarem os valores aqui apresentados, este trabalho serve como base para montar uma referência do perfil normal de linfócitos em gatos.

Palavras-chave: imunofenotipagem; citometria de fluxo; felinos.

ABSTRACT

CASTRO, Deborah, Universidade Federal da Paraíba, January, 2017. **Immunophenotypic findings of blood leukocytes in cats.** Adviser: Fabiana Satake.

Immunophenotyping is a flow cytometric technique that has been used in medicine for a long time but has just recently begun to be applied to veterinary medicine. It makes it possible to assess, diagnose and stage neoplasias after quantifying specific cells, which can guide the treatment and monitoring of the disease. For that, however, it is important to know the normal distribution of cells in each species. The present study aims to standardize the immunophenotypic pattern of healthy cats, quantifying lymphocytic cells expressing CD4, CD5, CD8, CD8 β , CD21, CD22 and MHC II by flow cytometry. Blood with EDTA was collected from 32 healthy animals and analyzed on FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). The mean concentration of cells expressing each antigen was: CD4 24.9%, CD8 12.3%, CD22 32.9%, MHC II 64.2%, and the proportion CD4:CD8 was 2.31%. The rest of the antigens expressed by the cells did not produce statistically significant results, so the median was used for analysis. The medians, as presented, were 24.2%, 25.3% and 11.4% respectively for CD5, CD21 and CD8 β . Although further research will be necessary to verify the presented values, this paper provides a basis to set a normal lymphocyte profile reference for cats.

Key-words: immunophenotyping; flow cytometry; felines.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1. Amostras de Sangue	14
2.2. Anticorpos e Reagentes	14
2.3. Preparação das Células	14
2.4. Análise Citométrica	15
2.5. Análise Estatística	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4. CONCLUSÃO	21
REFERÊNCIAS	22
APÊNDICE	26

1. INTRODUÇÃO

A imunofenotipagem, com a utilização da citometria de fluxo, tem sido eficiente na detecção de doenças malignas como leucemias, onde a diferenciação morfológica é importante para o diagnóstico e tem a grande vantagem de analisar pequenas quantidades de amostras obtidas de forma menos invasiva que outras técnicas como a imunohistoquímica, por exemplo. Com ela, é possível distinguir células a partir de suas proteínas de superfície, como no caso dos linfócitos (BURKHARD; BIENZLE, 2013; WILKERSON *et al.*, 2005).

Os linfócitos são células leucocitárias originadas na medula óssea e são as únicas células que participam da imunidade adaptativa, juntamente com os anticorpos produzidos por eles (ABBAS *et al.*, 2015). São divididos em populações de linfócitos B, responsáveis pela imunidade humoral; e linfócitos T que são responsáveis pela imunidade mediada por célula. Como não há diferença morfológica entre as células T e B, pode-se distinguir as diferentes populações de linfócitos a partir das proteínas expressadas em suas membranas (ABBAS *et al.*, 2015; SINK, C. A.; FELDMAN, 2006). Essas proteínas de superfície são nomeadas pelas letras CD (“*cluster of differentiation*”) seguidas por seu número. Por exemplo, proteínas como CD3, CD4, CD5 e CD8 são específicas para células T, enquanto as proteínas CD21 e CD22 são somente encontradas em células B (THRALL *et al.*, 2012). Há ainda moléculas expressas na superfície de outras células que se ligam a antígenos e os apresentam às células T para reconhecimento. Essas proteínas são conhecidas como complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Todas essas proteínas podem ser identificadas a partir da sua ligação a anticorpos específicos, conhecidos como anticorpos monoclonais, sendo necessário usar técnicas imunocitoquímicas para tal fim (ABBAS *et al.*, 2015).

A citometria de fluxo é capaz de selecionar células a partir de características como tamanho e granulosidade do citoplasma ao emitir raios laser em um único feixe de luz, avaliando células em suspensão de forma qualitativa e quantitativa. Além disso, é possível detectar a quantidade de fluorescência emitida pela célula, ao adicionar anticorpos monoclonais ligados a fluorocromos, o que permite a quantificação do número de células expressando uma mesma característica dentro da amostra (BYRNE *et al.*, 2000; REGGETI; BIENZLE, 2011; THRALL *et al.*, 2012; THOMASON *et al.*, 2014).

Podem ser avaliados diversos tipos de amostras, desde sangue, fluido cerebrospinal, fluido peritoneal, exsudativo ou transudativo, até amostras obtidas por punção aspirativa por

agulha fina (PAAF) de tecidos como linfonodos, por exemplo. Devido ao pequeno volume deste último, adiciona-se ao aspirado uma solução tampão para facilitar seu processamento (ANIOŁEK *et al.*, 2014). Aos demais fluidos é adicionado um anticoagulante, sendo o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) o mais indicado, pois permite uma melhor separação das populações de células se comparado à heparina (DEAN *et al.*, 1991).

Durante a coleta, deve-se evitar ao máximo o estresse, pois este causa agregação de plaquetas e imprecisão na contagem de linfócitos, visto que a agregação plaquetária pode também englobar células linfocíticas (LIN; LITSTER, 2013). Além disso, o estresse agudo pode causar aumento global das células brancas por 48 horas (KARANDIKAR *et al.*, 2002). Deve-se levar em conta, ainda, o armazenamento da amostra até seu processamento. Células mortas ou danificadas podem alterar o resultado, sendo recomendado manter a amostra resfriada por no máximo 2 a 3 dias para manter a viabilidade das células (ANIOŁEK *et al.*, 2014; REGGETI; BIENZLE, 2011).

Antes de avaliar a amostra no citômetro, existem várias etapas para a preparação das células. Primeiro, deve-se promover a lise total das hemácias (CALVELLI *et al.*, 1993; DUQUE *et al.*, 2002; REGGETI; BIENZLE, 2011; WEISS, 2002) ou separação de hemácias e leucócitos por gradiente de densidade (ABREU, 2010; BYRNE *et al.*, 2000; RENDLE *et al.*, 2007; TOMPKINS *et al.*, 1990). Para isolamento das células brancas, a lise de hemácias é mais rápida, constante, e requer quantidade menor de amostra do que a separação por gradiente de densidade (DEAN *et al.*, 1991), além do que, a centrifugação por gradiente de densidade pode causar alterações celulares (WEISS, 2002). Depois, é feita incubação da amostra em solução tampão a fim de estabilizar as células, bloqueando ligações inespecíficas de anticorpos. Para a confecção deste tampão seria ideal utilizar soro da mesma espécie do anticorpo secundário utilizado na amostra, contudo, devido à acessibilidade, geralmente é utilizado soro equino ou bovino (REGGETI; BIENZLE, 2011).

São adicionados, então, anticorpos monoclonais direcionados contra antígenos específicos na célula de interesse. Como na medicina veterinária ainda não há uma ampla variedade de anticorpos assim como existe na medicina humana, é possível combinar anticorpos de diferentes espécies dentro da amostra devido à reação cruzada, dependendo do antígeno em questão (THOMASON *et al.*, 2014). Os anticorpos monoclonais podem estar marcados diretamente com fluorocromos, como o isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e alofocianina (APC) ou não, sendo necessário neste último caso aplicar o

primeiro anticorpo, remover aqueles que não se ligaram e então adicionar um segundo anticorpo fluorescente. O anticorpo secundário é geralmente um anticorpo direcionado contra o fragmento cristalizável da imunoglobulina de camundongos, conhecido como anti-camundongo (REGGETI; BIENZLE, 2011; WEISS, 2002).

Devido a sua eficiência, a citometria de fluxo é empregada na identificação de células-tronco hematopoiéticas, contagem celular diferencial de amostras de medula óssea, contagem de linfócitos e plaquetas reticuladas em sangue periférico, pesquisa de parasitas intraeritrocitários e imunofenotipagem de linfócitos (NAKAGE *et al.*, 2005). A imunofenotipagem iniciou-se na área de pesquisa e ganhou espaço na clínica humana acompanhando pacientes HIV positivos, sendo utilizada para a contagem de CD4 e MHC de classe II, pois o baixo número de células apresentando estes marcadores aumentavam as chances de contrair outras doenças oportunistas (CALVELLI *et al.*, 1993; RIDEOUT *et al.*, 1990; WOO *et al.*, 1997). Hoje em dia a imunofenotipagem tem sido aplicada para diagnóstico e acompanhamento do tratamento de diversas enfermidades, principalmente as neoplasias, tendo em vista que as características morfológicas das hiperplasias são insuficientes para o diagnóstico da doença, apesar de fundamentais (ANIOŁEK *et al.*, 2014; THOMASON *et al.*, 2014).

Graças ao grande avanço nas pesquisas com anticorpos monoclonais e fluorocromos e ao aperfeiçoamento de citômetros de fluxo, a identificação das células afetadas por meio da citometria de fluxo está cada vez mais precisa. Na medicina veterinária, a imunofenotipagem tem sido empregada para o acompanhamento de determinadas doenças, como leucemia, linfoma, imunodeficiência felina (FIV) e leucemia viral felina (FeLV) (ACHLEITNER *et al.*, 2011; ANAI *et al.*, 2013; ANIOŁEK *et al.*, 2014; COMAZZI *et al.*, 2011; REGGETI; BIENZLE, 2011). Porém, saber a distribuição normal das populações de linfócitos em animais sadios torna o diagnóstico, monitoramento e prognóstico da doença mais eficazes e confiáveis a partir da citometria de fluxo (BYRNE *et al.*, 2000). Como esta técnica é pouco estudada na espécie felina, tem-se a carência de um perfil de anticorpos específicos para as linhagens celulares com um padrão imunofenotípico, importante para um melhor entendimento da epidemiologia de doenças como a leucemia em animais (REGGETI; BIENZLE, 2011). Assim, este trabalho teve como objetivo definir um perfil imunofenotípico de células linfocíticas em gatos domésticos sadios.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras de Sangue

Foram analisadas amostras sanguíneas de 32 gatos, sem distinção de sexo, raça ou idade, que não apresentaram, ao exame clínico, sinais de doença ou alterações no hemograma. As amostras estavam adicionadas ao anticoagulante EDTA e as coletas foram realizadas entre os meses de maio e agosto de 2014. Dentre os animais, 20 eram pacientes do hospital veterinário da Ontario Veterinary College (OVC) da Universidade de Guelph, Canadá, e 12 eram provenientes de um abrigo licenciado próximo à cidade de Guelph. Os animais mantidos no abrigo foram contidos quimicamente para realização do exame clínico e colheita de sangue, para tanto foram utilizados cloridrato de cetamina (10 mg/kg) associado ao cloridrato de medetomidina (80 µg/kg) administrados por via intramuscular.

2.2. Anticorpos e Reagentes

Foram usados anticorpos monoclonais contra os seguintes antígenos: CD4 marcado com FITC, CD8 marcado com PE, CD8β, CD21, MHC de classe II, CD5 e CD22 (ROCCABIANCA *et al.*, 2006). Aos anticorpos não conjugados a fluorocromos diretamente, foi adicionado um anticorpo anti-camundongo conjugado ao fluorocromo PE (GAM-PE) que também foi utilizado sozinho no primeiro tubo como controle negativo. Os anticorpos são produzidos por P. Moore, UC, Davis, CA, e o clone específico para cada anticorpo pode ser conferido na Tabela 1.

A solução tampão foi confeccionada de acordo com Gibson *et al.* (2004) e o pH foi ajustado para 7,4. Já o tampão de lise de hemácias (10x) foi produzido a partir de 8,99 g de NH₄Cl, 1 g de KHCO₃, 0,2 ml de 5mM Na₄EDTA em 100 ml de água deionizada. O pH foi ajustado para 7,3 e mantido a 4°C, sendo diluído cada vez antes de ser usado.

2.3. Preparação das Células

Foram adicionados 50µl de sangue em sete tubos de ensaio. Diluiu-se 1 ml do tampão de lise de hemácias (10x) em 9 ml de água deionizada antes de adicionar 700µl desse tampão diluído (1x) em cada tubo com sangue, que permaneceram em temperatura ambiente por 5 minutos. Foi adicionado 1 ml de solução tampão para então centrifugar a 500 x g, durante 10 minutos. O sobrenadante era despejado e avaliava-se a necessidade de repetir o processo caso não estivesse completamente lisado. Após a lise de hemácias, as amostras foram marcadas

seguindo o mesmo protocolo de Gibson *et al.* (2004) nas quantidades apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Relação de anticorpos e suas quantidades a serem adicionadas em cada tubo, para caracterização imunofenotípica de linfócitos em gatos, na Universidade de Guelph, Canadá, no ano de 2014

Tubo	1 ^o anticorpo	Clones	Quantidade (ul)	2 ^o anticorpo	Quantidade (ul)
1	-	-	-	GAM-PE	10 de 1/100
2	CD4 FITC	3-4F4	3 de 1/10	-	-
	CD8 PE	FT2	3 de 1/10	-	-
3	CD8 β	Fe5.4D2	20	GAM-PE	10 de 1/100
4	CD 21	CA2.1D6	20	GAM-PE	10 de 1/100
5	MHC II	42.3	20	GAM-PE	10 de 1/100
6	CD5	Fel.1B11	20	GAM-PE	10 de 1/100
7	CD22	Fe2.9F2	30	GAM-PE	10 de 1/100

Onde: CD: *cluster of differentiation*, FITC: isotiocianato de fluoresceína, GAM: *goat anti-mouse*, MHC: complexo principal de histocompatibilidade, PE: ficoeritrina

2.4. Análise Citométrica

O citômetro utilizado para realização deste trabalho foi o FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA), e foi adicionado fluido de envolvimento (*sheath fluid*) em cada tubo de ensaio antes de ser analisado na máquina. O tubo controle foi utilizado para determinar a configuração a ser utilizada para os demais tubos. Utilizando o programa BD CellQuest Pro, foram obtidos no mínimo 100.000 eventos de cada tubo e foi delimitado um *gate* na população de linfócitos, a partir da qual era disponibilizada pelo programa a porcentagem para cada marcador.

2.5. Análise Estatística

A análise estatística foi feita por meio do programa GraphPad Prism 5. Foi usado o teste de normalidade Shapiro-Wilk para cada tipo celular individualmente. Quando $\alpha > 0,05$ o valor foi considerado dentro da normalidade e foram calculadas as médias e intervalos de confiança. Caso contrário, calculou-se a mediana e os quartis 25% (Q1) e 75% (Q3).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados disponibilizados pelo aparelho estão demonstrados na Figura 1 e a relação completa da concentração de todos os antígenos para cada animal pode ser encontrada no Apêndice A.

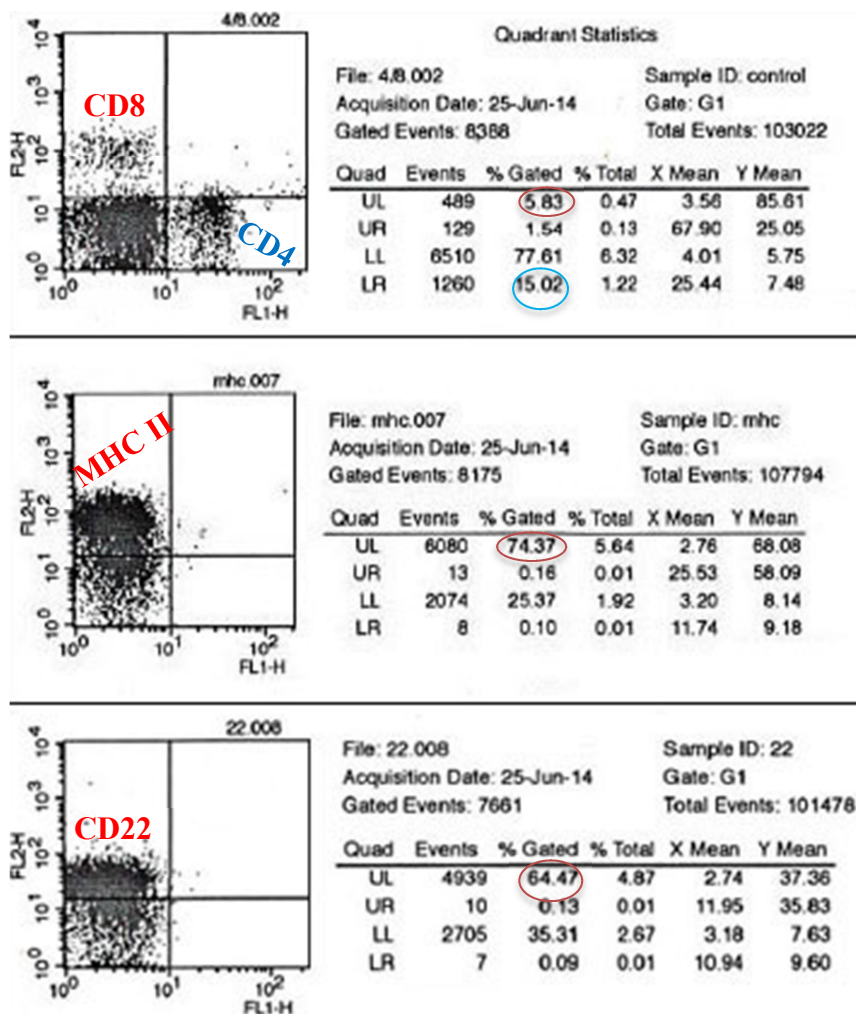


Figura 1. Resultado disponibilizado pelo programa BD CellQuest Pro dos marcadores cujos valores estavam dentro da normalidade, em amostra de sangue do gato 8, durante estudo de imunofenotipagem em felinos na Universidade de Guelph, Canadá, no ano de 2014.

Somente os valores para CD4, CD8, MHC II e CD22 passaram no teste de normalidade. Suas médias, intervalo de confiança (IC) e erro padrão podem ser conferidos na Tabela 2, bem como a proporção CD4:CD8. Para os demais marcadores que não passaram no teste de normalidade, foram determinadas suas medianas, primeiro quartil (Q1) e terceiro

quartil (Q3) apresentados na Tabela 3. Uma comparação completa entre todos os marcadores e suas variâncias pode ser feita no diagrama de caixa (FIGURA 2).

Tabela 2. Porcentagem de células apresentando marcadores que se mostraram dentro da normalidade em estudo de imunofenotipagem de linfócitos felinos realizado na Universidade de Guelph, Canadá, no ano de 2014.

	CD4	CD8	CD4:CD8	MHC II	CD22
Média (%)	24,9	12,3	2,31	64,2	32,9
IC	20,1 – 29,7	10,2 – 14,4	1,84 – 2,77	56,5 – 71,9	26,7 – 39,1
Erro Padrão	2,34	1,01	0,22	3,78	3,02

Onde: IC: intervalo de confiança

A porcentagem (%) de células apresentando CD4 condiz com o achado por Gibson *et al.* (2004) em linfonodo de cães (22,1%). Apesar de Grindem *et al.*, (1998) afirmarem que os resultados de imunofenotipagem de sangue periférico e aspirado de linfonodo tendem a ser parecidos, há uma grande discrepância entre o resultado de Gibson *et al.*, (2004) e os valores encontrados em pesquisas com sangue de gatos, que mostram uma variação entre 31,8 – 44,5% (BYRNE *et al.*, 2000; DEAN *et al.*, 1991; HOFFMANN-FEZER *et al.*, 1996; LITSTER *et al.*, 2014; TOMPKINS *et al.*, 1990). No estudo dirigido por Hoffmann-Fezer *et al.*, (1992), gatos machos e gatos castrados, tanto machos quanto fêmeas, apresentaram menor número de CD4, sendo este o perfil da maioria dos animais aqui testados. Sabe-se que os felinos estudados por Byrne *et al.* (2000) eram fêmeas inteiras, talvez explicando sua discrepância (44,5%) com os demais estudos. O valor para CD8 encontrado neste estudo se encontra pouco abaixo do relatado por Hoffmann-Fezer *et al.* (1996) e Klotz e Cooper (1986), que usaram o mesmo clone (FT2). Apesar de terem optado por separar as células vermelhas por gradiente de densidade, Hoffmann-Fezer *et al.* (1996) afirmaram que seus resultados não tiveram diferença significativa daquelas amostras preparadas com tampão de lise de hemácias.

Tabela 3. Porcentagem de células apresentando marcadores que não passaram no teste de normalidade em estudo de imunofenotipagem de linfócitos felinos realizado na Universidade de Guelph, Canadá, no ano de 2014.

	CD8B	CD21	CD5
Mediana (%)	11,4	25,3	24,2
Q1	9,50	17,1	16,8
Q3	17,2	47,9	36,0

Onde: Q1: primeiro quartil, Q3: terceiro quartil

A proporção de CD4:CD8 encontrada foi de 2,31 e está dentro da variação encontrada por Byrne *et al.* (2000) (1,1 - 3,05%) em gatos. Bortnick *et al.* (1999) reportaram média de 2,9% em felinos de 90 dias de idade e justificaram que CD8 pode aumentar conforme o animal envelhece e se expõe a agentes parasitários, bacterianos, virais, bem como vacinações, o que leva a uma diminuição da proporção CD4:CD8. Apesar do valor de CD4 ter sido bem abaixo dos valores encontrados na literatura para gatos, e CD8 relativamente menor que os valores encontrados nos primeiros estudos com este clone, a proporção CD4:CD8 foi mantida dentro dos valores normais previamente relatados.

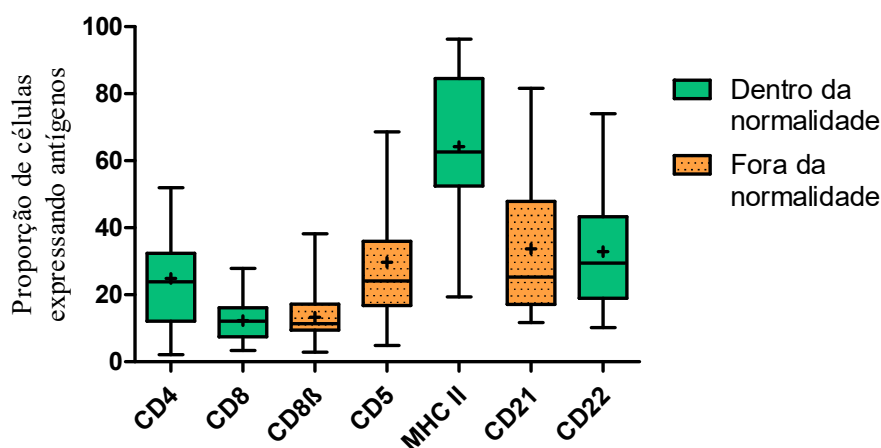


Figura 2. Diagrama de caixa indicando as variâncias de cada antígeno expressado por leucócitos de gatos em estudo de imunofenotipagem linfocítica realizado na Universidade de Guelph, Canadá, em 2014.

O número de células que apresentaram MHC II (64,2%) foi abaixo do esperado, visto que todas as células apresentadoras de antígeno devem expressar tal antígeno. Apesar dos valores apresentados por Gibson *et al.* (2004) e Byrne *et al.* (2000) também serem baixos, os clones usados em ambas as pesquisas são diferentes do 42.3H2 usado no presente trabalho. Os primeiros pesquisadores a testarem o clone 42.3H2 encontraram 88,97% de células marcadas para MHC II em gatos (RIDEOUT *et al.*, 1990), estando discrepante com o valor aqui encontrado.

Woo *et al.* (1997) foram uns dos poucos pesquisadores a demonstrar a expressão de CD22 usando o clone Fe2.9F2 e apresentaram uma porcentagem média de 34,16% em gatos infectados com FIV, valor este próximo ao aqui encontrado (32,9%), porém necessita-se de

mais estudos para estabelecer-se um padrão com gatos saudáveis. Por ser uma proteína intracelular, o antígeno CD22 deve ser usado com cautela e acaba sendo menos usado nas pesquisas para identificação das células B, sendo preferível a identificação destas por meio do antígeno CD21 (REGGETI; BIENZLE, 2011).

Todos os valores encontrados na literatura, em cães ou gatos, se encaixam dentro da variação de Q1 e Q3 para CD21 expressada aqui (DUQUE *et al.*, 2002; GIBSON *et al.*, 2004; LIN; LITSTER, 2013; WILKERSON *et al.*, 2005). Deve-se levar em consideração que nem todas as amostras expressaram CD21 (26/32), alterando assim sua concentração média. Entretanto, considerando que o antígeno CD21 é expressado por células do tipo B maduras (ANIOŁEK *et al.*, 2014; BURKHARD; BIENZLE, 2013) assim como CD22, seus valores devem ser parecidos.

Apenas 25 de 32 animais expressaram CD8 β e CD5, o que alterou suas médias de concentração. Wilkerson *et al.* (2005) relataram uma porcentagem de 16% para CD8 β em linfonodos de cães saudáveis, valor aproximado com o Q3 encontrado no presente trabalho. O valor para CD5 está abaixo do encontrado por Lin e Litster (2013) em gatos negativos para FIV e por Abreu (2010) em cães saudáveis. Gatos com linfoma não expressaram CD8 β ou CD22, e tiveram baixa expressão de CD5 (ROCCABIANCA *et al.*, 2006), não sendo possível fazer uma comparação precisa, visto que não há na literatura outras pesquisas com estes anticorpos em gatos saudáveis.

Entretanto, considerando-se que CD5 representa todas as células T e ainda está presente em algumas células do tipo B, e CD4 e CD8 são subtipos específicos (ANIOŁEK *et al.*, 2014; BURKHARD; BIENZLE, 2013; THRALL *et al.*, 2012), espera-se que o valor de CD5 seja maior que CD4, o que não foi visto nesse trabalho. Ao identificar células expressando CD3, que deveria ser próximo ao valor de CD5, seria possível confirmar o número de células T e identificar o marcador que traz anormalidade. Visto que o MHC II também se encontra fora do padrão, seria ideal quantificar CD45, pois este define o número de leucócitos totais, permitindo assim uma melhor comparação com os dados dos outros marcadores (THRALL *et al.*, 2012).

A razão para a discrepância de dados não está clara, podendo esta ser atribuída a diversos fatores. Vários valores estão abaixo do esperado, não sugerindo problema de um antígeno específico, mas sim da amostra como um todo ou do processamento. Para os animais

do abrigo, pode-se considerar o estresse crônico devido ao confinamento, o que causa inconsistência nos valores linfocíticos (KARANDIKAR *et al.*, 2002; LIN; LITSTER, 2013). Quando separados dos demais animais e comparados os dois grupos, os valores para os gatos do abrigo não foram estatisticamente diferentes. Porém, se desconsiderarmos estes animais, o valor de CD8 β fica dentro da normalidade e a mediana de CD21 fica próximo à média de CD22. Além do que, atrasos para processar a amostra podem diminuir o número da amostragem devido a morte celular ou por diminuição da expressão de determinadas proteínas de superfície (ANIOŁEK *et al.*, 2014) e, apesar de todas as amostras terem sido resfriadas caso não fossem processadas no mesmo dia da coleta, as amostras do hospital veterinário passaram algumas horas em temperatura ambiente (média de 20°C) durante a confecção do hemograma, sem contar as amostras do abrigo que eram transportadas por pelo menos uma hora até o laboratório, em temperatura média de 16,4°C, com máxima de 29,2°C, durante o período das coletas (Environment and Climate Change Canada, 2016).

No entanto, o protocolo para processamento das amostras foi idêntico ao utilizado para diagnosticar cães com linfoma no laboratório PAHL 3806 da Universidade de Guelph, além do que vários artigos citam o mesmo protocolo (ACHLEITNER *et al.*, 2011; DUQUE *et al.*, 2002; GAUTHIER *et al.*, 2005; GIBSON *et al.*, 2004). A não ser que faça-se um protocolo específico para gatos, o dilema não parece vir da técnica aplicada. Todos os trabalhos na literatura parecem sugerir a captura de 10.000 eventos para avaliação no citômetro. Ao analisarmos 100.000 eventos, aumenta-se também o número de células não linfocíticas, como granulócitos e macrófagos, o que pode ter interferido no resultado. Sendo assim, devido à falta de dados, novas pesquisas com os mesmos clones se fazem necessárias para estabelecer uma caracterização precisa dos linfócitos felinos.

4. CONCLUSÃO

O presente estudo contribui para a caracterização imunofenotípica de linfócitos em gatos saudáveis. A determinação do valor para CD22 foi importante visto que não há relatos na literatura para gatos saudáveis com esse antígeno. No entanto, se fazem necessários mais estudos para validar os valores encontrados neste trabalho. Além dos antígenos aqui testados, estudos com CD3 e CD45 também se fazem necessários para melhor comparação entre os antígenos e confirmação de seus valores. Sugerem-se, ainda, estudos com grupos de animais de idade específica, para excluir a interferência desse fator.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltd, 2015.
- ABREU, D. K. **Padronização do perfil hematológico, bioquímico, proteinograma sérico e imunofenotipagem de linfócitos de cães da raça Golden Retriever sadios e afetados pela distrofia muscular**. São Paulo, 2010. 156p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- ACHLEITNER, A.; CLARK, M. E.; BIENZLE, D. T-regulatory cells infected with feline immunodeficiency virus up-regulate programmed death-1 (PD-1). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 143, n. 3–4, p. 307–313, 2011.
- ANAI, L. A. et al. Avaliação leucocitária de cães com linfoma submetidos ao protocolo de Madison-Wisconsin pela técnica convencional e citometria de fluxo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 4, p. 1793–1800, 2013.
- ANIOŁEK, O.; GAJEWSKI, Z.; GIZIŃSKI, S. Application of flow cytometry in diagnosing lymphomas in dogs and cats. **Central European Journal of Immunology**, v. 3, n. 3, p. 327–330, 2014.
- BORTNICK, S. J. et al. Lymphocyte Subsets in Neonatal and Juvenile Cats: Comparison of Blood and Lymphoid Tissues. **Laboratory Animal Science**, v. 49, n. 4, p. 395–400, 1999.
- BURKHARD, M. J.; BIENZLE, D. Making Sense of Lymphoma Diagnostics in Small Animal Patients Lymphoma Cytology Immunophenotyping Flow cytometry. **Vet Clin Small Anim**, v. 43, p. 1331–1347, 2013.
- BYRNE, K. M. et al. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, n. 2, p. 167–182, 2000.
- CALVELLI, T. et al. Guideline for flow cytometric immunophenotyping: a report from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of AIDS. **Cytometry**, v. 14, n. 7, p. 702–15, 1993.
- COMAZZI, S. et al. Immunophenotype predicts survival time in dogs with chronic lymphocytic leukemia. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 1, p. 100–6, 2011.
- DEAN, G. A. et al. Flow cytometric analysis of T-lymphocyte subsets in cats. **Veterinary**

Immunology and Immunopathology, v. 28, n. 3–4, p. 327–335, 1991.

DUQUE, C.; PARENT, J.; BIENZLE, D. The immunophenotype of blood and cerebrospinal fluid mononuclear cells in dogs. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, p. 714–719, 2002.

GAUTHIER, M. J. et al. The immunophenotype of peripheral blood lymphocytes in clinically healthy dogs and dogs with lymphoma in remission. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, p. 193–199, 2005.

GIBSON, D. et al. Flow cytometric immunophenotype of canine lymph node aspirates. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, p. 710–717, 2004.

GRINDEM, C. B. et al. Immunophenotypic Comparison of Blood and Lymph Node from Dogs with Lymphoma. **Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology**, v. 27, n. 1, p. 16–20, 1998.

HOFFMANN-FEZER, G. et al. Decline in CD4 + Cell Numbers in Cats with Naturally Acquired Feline Immunodeficiency Virus Infection. **Journal of virology**, v. 66, n. 3, p. 1484–1488, 1992.

HOFFMANN-FEZER, G. et al. Comparison of T-cell subpopulations in cats naturally infected with feline leukaemia virus or feline immunodeficiency virus. **Research in veterinary science**, v. 61, n. 3, p. 222–226, 1996.

KARANDIKAR, N. J. et al. Transient Stress Lymphocytosis An Immunophenotypic Characterization of the Most Common Cause of Newly Identified Adult Lymphocytosis in a Tertiary Hospital. **Am J Clin Pathol**, p. 819–825, 2002.

KLOTZ, F. W. .; COOPER, M. D. A feline thymocyte antigen by a monoclonal antibody (FT2) identifies a subpopulation of non-helper cells capable of specific cytotoxicity. **Journal of Immunology**, v. 136, p. 2510–2514, 1986.

LIN, J.; LITSTER, A. Fluorescence flow cytometry methodology to exclude platelet aggregate interference when measuring feline CD4 and CD8 lymphocyte counts. **Veterinary Journal**, v. 198, n. 1, p. 275–278, 2013.

LITSTER, A. et al. Diagnostic utility of CD4%:CD8low% T-lymphocyte ratio to differentiate feline immunodeficiency virus (FIV)-infected from FIV-vaccinated cats. **Veterinary Microbiology**, v. 170, n. 3–4, p. 197–205, 2014.

MONTHLY Climate Summaries. New Brunswick: Environment Canada, 2016. Disponível em: http://climate.weather.gc.ca/prods_servs/cdn_climate_summary_e.html. Acesso em 10 fev. 2017.

NAKAGE, A. P. M. et al. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 966–973, 2005.

REGGETI, F.; BIENZLE, D. Flow cytometry in veterinary oncology. **Veterinary pathology**, v. 48, n. September 2010, p. 223–235, 2011.

RENDLE, D. I. et al. Clinical, immunophenotypic and functional characterisation of T-cell leukaemia in six horses. **Equine veterinary journal**, v. 39, n. 6, p. 522–8, 2007.

RIDEOUT, B.; MOORE, P.; PEDERSEN, N. Distribution of MHC class II antigens in feline tissues and peripheral blood. **Tissue antigens**, p. 221–227, 1990.

ROCCABIANCA, P. et al. Feline large granular lymphocyte (LGL) lymphoma with secondary leukemia: primary intestinal origin with predominance of a CD3/CD8(alpha)(alpha) phenotype. **Veterinary pathology**, v. 43, n. 2006, p. 15–28, 2006.

SINK, C. A.; FELDMAN, B. F. **Urinálise e Hematologia Laboratorial para o Clínico de Pequenos Animais**. 1. ed. São Paulo: Rocca, 2006.

THOMASON, J. et al. Applications of Flow Cytometry in Veterinary Research and Small Animal Clinical Practice. **J Vet Med Res**, 2014.

THRALL, M. A. et al. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 2. ed. Danvers: Wiley-Blackwell, 2012.

TOMPKINS, M. B. et al. Characterization of monoclonal antibodies to feline T-lymphocytes and their use in the analysis of lymphocyte tissue distribution in the cat. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 26, 1990.

WEISS, D. J. Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. **Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology**, v. 31, n. 2, p. 72–82, 2002.

WILKERSON, M. J. et al. Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 106, n. 3–4, p. 179–196, 2005.

WOO, J. C. et al. Immunopathologic changes in the thymus during the acute stage of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in juvenile cats. **Journal of virology**, v. 71, n. 11, p. 8632–8641, 1997.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Porcentagem de células expressando CD4, CD8, CD8 β , CD21, MHC II, CD25 e CD22 em gatos do abrigo ^(a) e pacientes do OVC ^(b).

(continua)								
Gato	CD4	CD8	CD4/8	CD8β	CD21	MHC II	CD5	CD22
1^a	44,84	8,31	5,39	-	-	53,33	20,78	19,92
2^a	11,09	10,82	1,02	-	32,25	61,21	19,2	30,25
3^a	45,66	9,39	4,86	-	13,01	31,82	10,77	23,85
4^a	17,88	13,85	1,29	-	24,42	63,55	-	19,25
5^a	26,54	13,73	1,93	-	44,95	68,96	21,74	18,96
6^b	24,06	21,63	1,11	17,02	-	52,14	15,89	15,02
7^b	22,69	13,09	1,73	12,75	13,13	55,12	-	12,43
8^b	15,02	5,83	2,57	5,42	56,65	74,37	17,93	64,47
9^b	32,43	16,76	1,93	11,55	14,19	32,16	-	-
10^b	29,45	7,13	4,13	-	14,18	64,53	-	43,1
11^a	30,84	12,01	2,56	11,36	20,36	19,41	-	47,84
12^a	45,01	16,39	2,74	17,45	15,67	51,84	38,76	24,3
13^a	37,2	12,13	3,06	10,26	-	35,63	-	24,08
14^a	22,41	12,07	1,85	11,19	-	42,62	28,7	41,76
15^b	18,8	16,48	1,14	15,93	18,7	61,62	7,1	36,1
16^b	11,68	3,4	3,43	2,9	41,5	77,47	4,89	74,01
17^b	43,72	22,5	1,94	23,15	11,68	61,56	25,81	16,27
18^b	32,12	11,36	2,82	9,48	36,8	72,3	28,73	28,45
19^b	12	12,12	0,99	10,54	17,58	55,5	16,16	35,03
20^b	29,29	5,92	4,94	6,16	41,33	70,62	24,15	44,27
21^b	10,01	7,47	1,34	-	-	53,76	-	59,62
22^b	23,75	12,67	1,87	10,68	-	53,81	11,11	42,85
23^b	16,6	7,49	2,21	10,23	60,71	68,58	32,63	43,83

APÊNDICE A – Porcentagem de células expressando CD4, CD8, CD8 β , CD21, MHC II, CD25 e CD22 em gatos do abrigo ^(a) e pacientes do OVC ^(b).

(conclusão)								
Gato	CD4	CD8	CD4/8	CD8β	CD21	MHC II	CD5	CD22
24 ^b	5,99	15,35	0,39	16,53	58,26	87,02	33,18	18,8
25 ^b	51,96	17,51	2,96	20,92	19,3	93,97	68,63	10,22
26 ^b	12,52	4,74	2,64	9,51	59,91	86,92	29,28	28,67
27 ^b	11,69	6,58	1,77	7,71	67,85	95,17	21,92	31,11
28 ^b	43,04	12,14	3,54	11,68	19,69	31,88	55,91	-
29 ^b	11,26	3,62	3,11	4,26	81,63	96,32	17,36	58,77
30 ^a	30,13	19,97	1,5	20,18	43,21	94,51	56,81	39,77
31 ^a	25,13	27,84	0,90	38,19	26,11	93,38	66,45	16,3
32 ^a	2,11	13,12	0,16	18,27	23,17	93,32	67,91	18,02

Onde: CD – cluster of differentiation, MHC – complexo principal de histocompatibilidade e OVC – Ontario Veterinary College